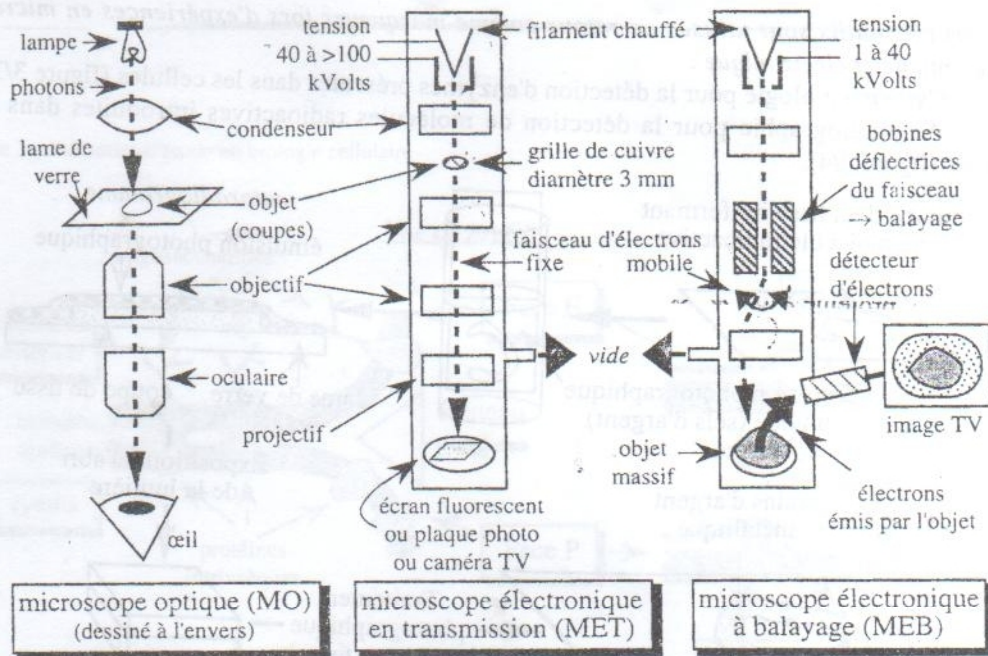


Figure 3/1 : caractéristiques du microscope optique, du microscope électronique en transmission et du microscope électronique à balayage

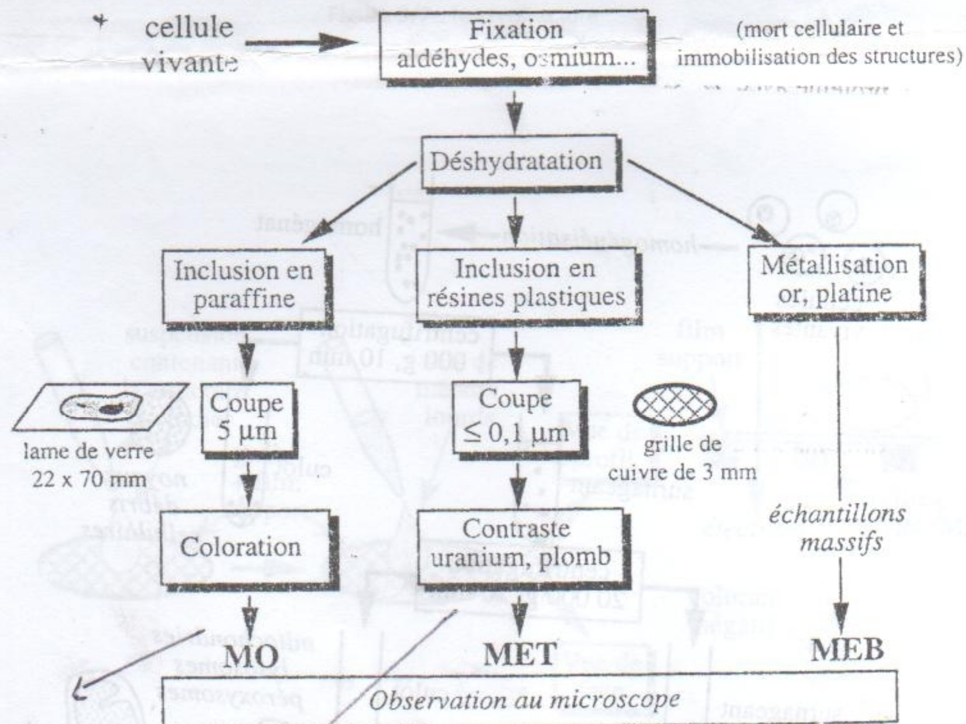


Figure 3/2 : schéma de préparation des échantillons pour l'examen au microscope

a) Ces outils sont utilisés en retour comme marqueurs lors d'expériences en microscopie optique et électronique :

– Cytoenzymologie pour la détection d'enzymes présentes dans les cellules (figure 3/3).

– Autoradiographie pour la détection de molécules radioactives introduites dans les cellules (figure 3/4).

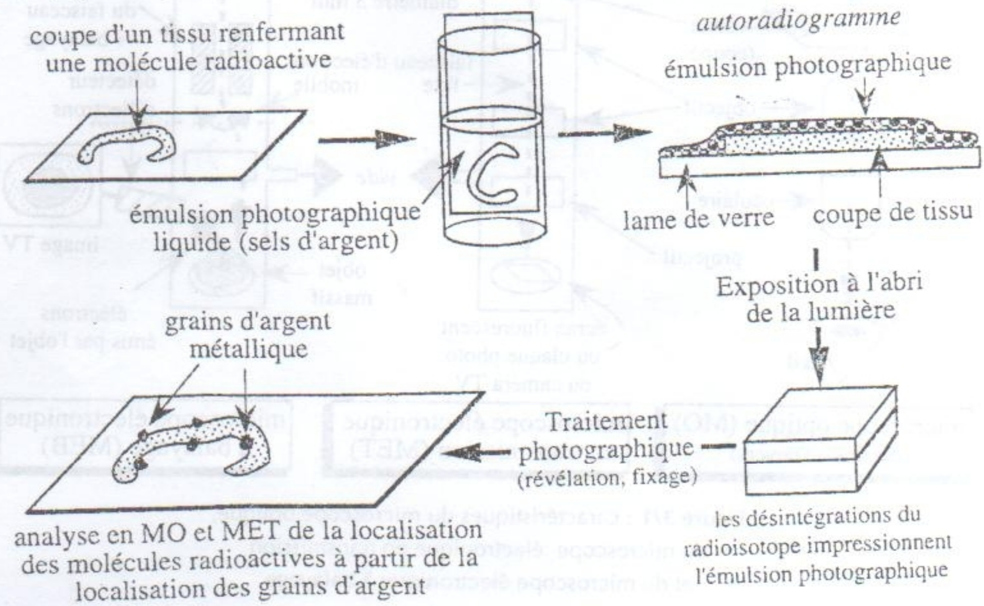
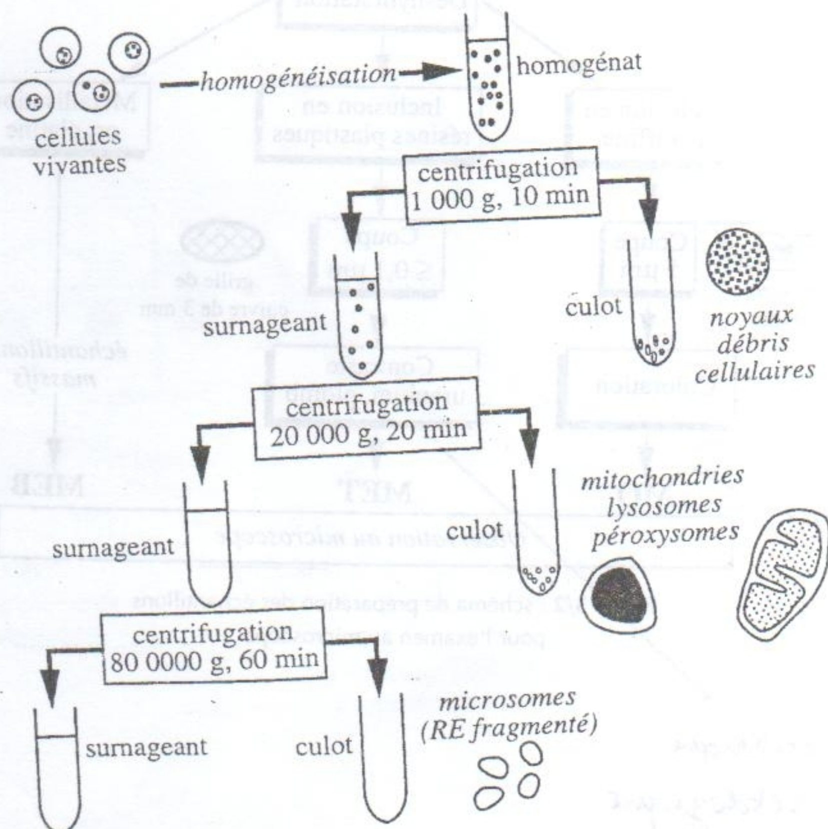


Figure 3/4 : principe de l'autoradiographie



La vitesse est exprimée en unités g (accélération de la pesanteur).

Figure 3/11 : principe du fractionnement subcellulaire par centrifugation

protéine

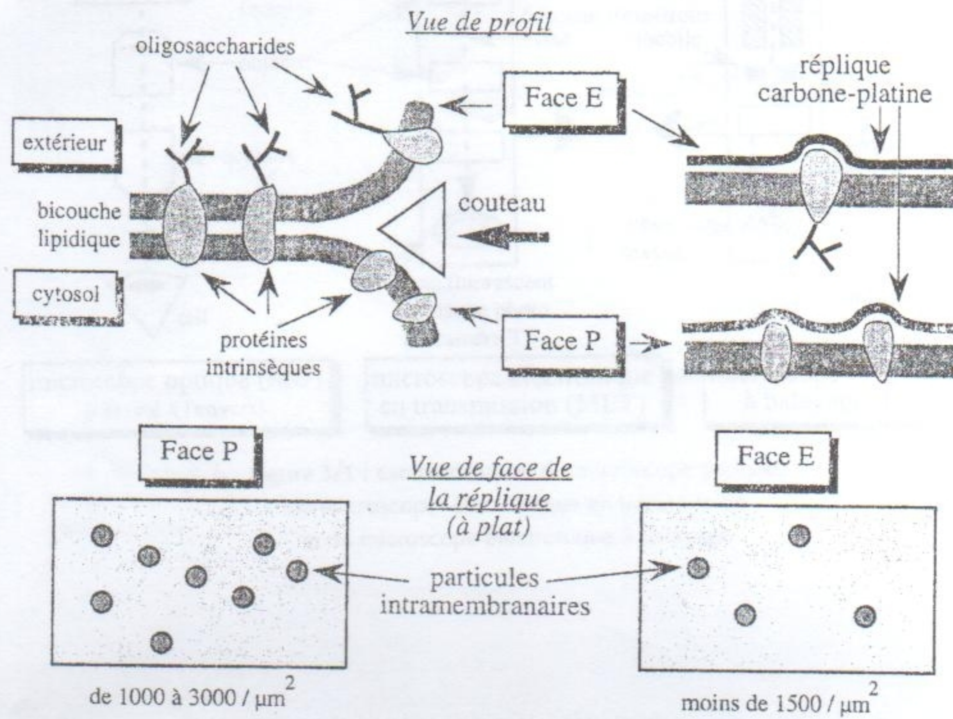


Figure 3/7 : la cryofracture

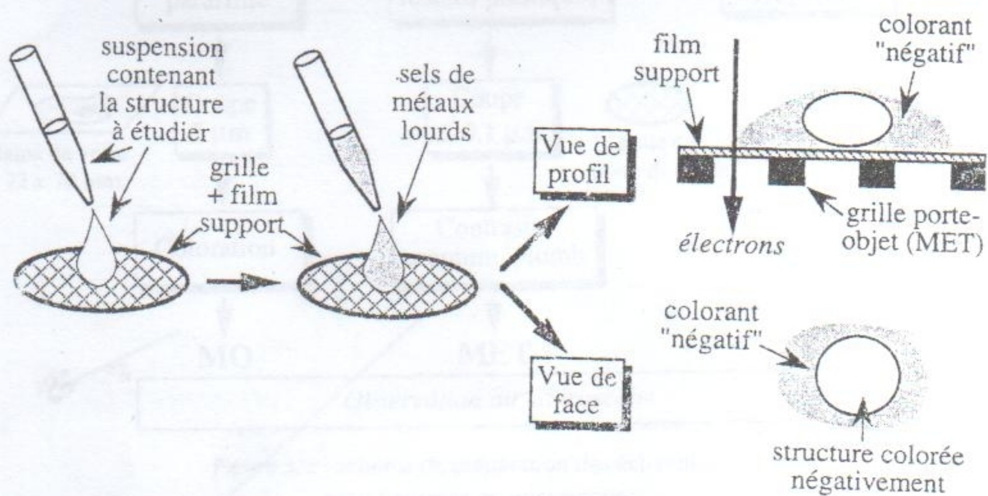


Figure 3/6 : coloration négative
en microscopie électronique en transmission

بسم الله الرحمن الرحيم

TD01.

Les differentes types de microscope (M)

(MO) M. optique (photonique)

1- Source lumineuse

2- Lentille en verre.

3- Pouvoir de résolution (séparation)

- 0,2nm -

M.e⁻

1- Source d'e⁻

2- Lentille e⁻ magnitique

3- Pouvoir de résolution

0,2nm - 7nm

• Les trois types de M.O : (sont classé par l'eclératis qui existe entre la molecule et la lieve)

MO

1. M.O à lumière directe (fond clair)

lampe

(cellules mortes) colorés

2. M.O à contraste de phase

Phase1

phase2

• cellules vivantes et pas colorés

• Déphasage selon l'indice de refraxition

3. M.O à fluorescence (fond noir)

onde 01

onde 02

• Utilisat des marbeurs fluorescence.

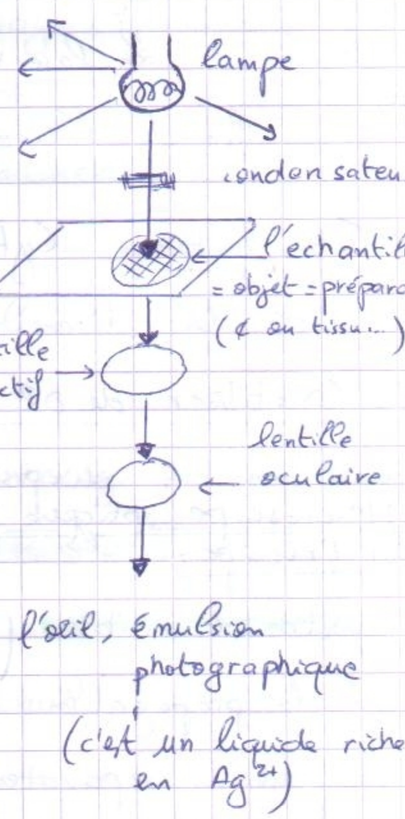
• Cellules mortes.

• Molecule capable de transformer la langeur d'onde.

• Changement de la langueur d'onde = changement de la couleur.

• La ou il ya un changement d'onde voit "une couleur"

• La ou il ya pas on voie "fond noie".



• Il ya autre type de M.O (raremant utiliser) :

1) MO à lumière U.V (lentille en quartz) :

• La molecule ressoit des U.V. En suite on a une absorbtion des U.V par ces molecules => donne des rayon transparente.

2) MO à lumière polarisée :

• Possède 02 pôles (prismes) : l'un entre la lumière et l'echantillon et l'autre entre lentille objectif et lentille oculaire.

• Role de prisme : Analyse des rayons.

3) MO confocal a balayage laser : le plus dévelopé, on utilise le laser. Le laser vas balié l'echantillon point par point, en suite à la fin de l'examen on voie une representation de l'echantillon en 3D

Introduction : Cytologie permet de comprendre la structure et les activités des divers éliments cellulaire.

. Constituer de 02 systeme de lentille : objectif et l'oculaire ainsi que des dispositifs de mise au point et de choix de grossissement

I) Microscope optique (MO) :

a) Pricipe : le M.O utilise des radiation electromagnetique de spectre de visible (proche de l'infra rouge ou de U.V) dans la propagation divié puis focaliser (concentrer) par les lentilles.

• Le pouvoir separateur peut alteindre 0,2 µm, il permet d'obtenir un grossissement de 1000 voir 2000 X (fois) .

b) caratéristique : - Une source de rayonement lumineux.

- Une obtique constituer de plusieur lentilles.

- Un ditecteur permeltant l'observation ou l'enregistrement de l'image (l'oeil et émulsion photographique).

c) Classification : les molecules a observés interagissent avec la lumière de plusieurs façons, ce qui nous a permer de classe les microscope en 03 types :

... à lumiére directe (fond clair) : les molecules intergissent avec la lumiére en absorbant certain longueur d'onde de la lumiére.
exp : observation de bactérie, des organites cellulaire,
la lumiére émise par la lampe (une) est concentrée (par) sur la preparation selon l'intensité de coloration, donc la lumière sera plus au moin absorbé.

2) Mo à contraste de phase :
Cette technique permet l'observation des cellules sont preparation et colouration (cellules vivantes). Les molecule interagissent avec la lumiére en provoquant un dirassage des rayons lumineux, lorsque la lumiére traverse l'echantillon, la phase de l'onde lumineuse est changé selon l'indice de refraction de la cellule.
exp : la lumiére traversant une partie dense, comme le noyau est retardé changeant insi de phase par apport à la lumiére ayant traversé une région plus mince (le sytoplasme)

) Mo à fluorescence (fond noire) : Les molecules interagissent avec la lumiére en emettant de la lumieré à une autre longueur d'onde de celle d'origine.
Les rayons lumineux prevenant d'un (condodateur) condencateur dont l'ouverture d'eclairage focalise la lumiére sur la préparation arrivant lateralement et oblique sur l'objet.
toute particule capablent de defusé de la lumiére devient briallante, alors que le fond de l'observation apparait en noire.

D) M.O spécifiques : ① M à lumiére U.V

il utilise le rayonnement U.V au lieu de la lumiére de visible et un systeme optique [(lentille en quartz) ou (fluorite)].
C'est des miroir en alumenum (Al).

2) M. à lumière polarisée : il est equipé de 2 prismes de NI[COL] l'un est interposé entre la source lumineuse et la préparation, l'autr[e] l'objectif et l'oculaire et permet de determiner la nature et la quantité des constituent meneraux.

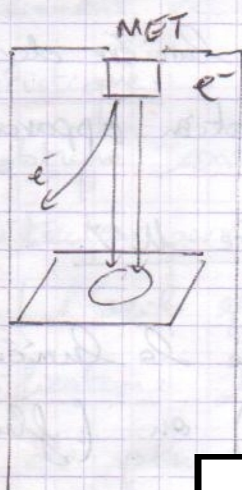
3) M. confocal à balayage laser : Ce microscope est equipé d'[une] source laser apartir de laquel un faisceau est focalisé au plant objet, un dispositif assur le balayage de la preparati[on] par les faisceaux laser.

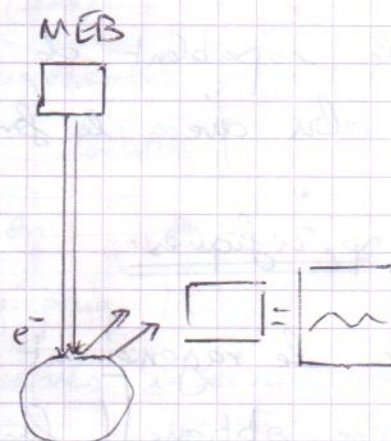
les signaux sont capté par un détecteur et transmit par un sy[stème] informatique ; Ce microscope necessite l'usage de marqueur fluor[escent] exitable par le faisceaux laser.

II) M electronique (ME) :

- ME à transmition : image issue de la transmition des e⁻. (les e traverse l'éch[antillon]) (plus détailler)
- ME à balayage : - on utilise des chantillons volumineux massif.
  - L'image issue par des e qui bombarde l'échantillon.

- MET : 0,2 nm superieur à MEB 7 nm
- La qualité de l'image depand de
  - la vitesse des e⁻ d'accélération et l'echantillon (volum de la coupe) => C'est pour le MET.





Microscope électronique :

Caracteristiques : - Un ensemble de pompage d'é distiner assuré un vide dans l'enceinte (carcasse) du microscope.

- Une source constitué generalement d'une surface methalique qui constitué un reservoir inepuiseable d'é.
- Lentille électro-magnetique.
- Un étage porte echantillon.
- Un systeme d'enregistrement et de visualisation d'image produite par les é.

Classification : 1) Mé à transmission : - Le pouvoir separateur = 0,2
- La formation de l'image resulte de la transmition des é à travers l'echantillon.
- L'image se forme sur un écran fluorescent.

2) Mé à balayage : la formation de l'image resulte de la reflection des é par l'echantillon, elle permet d'observer l'image reliefe à la surface de l'echantillon avec une representation tri dimentionel, il oufre un pouvoir de séparateur (de résolution) égale à 07 pm.

TD02 : Technique d'étude de la cellule. (sesont des tech de groupe mince)

I) Technique histologique :

1) Prelevement → ponction
→ Biopsie

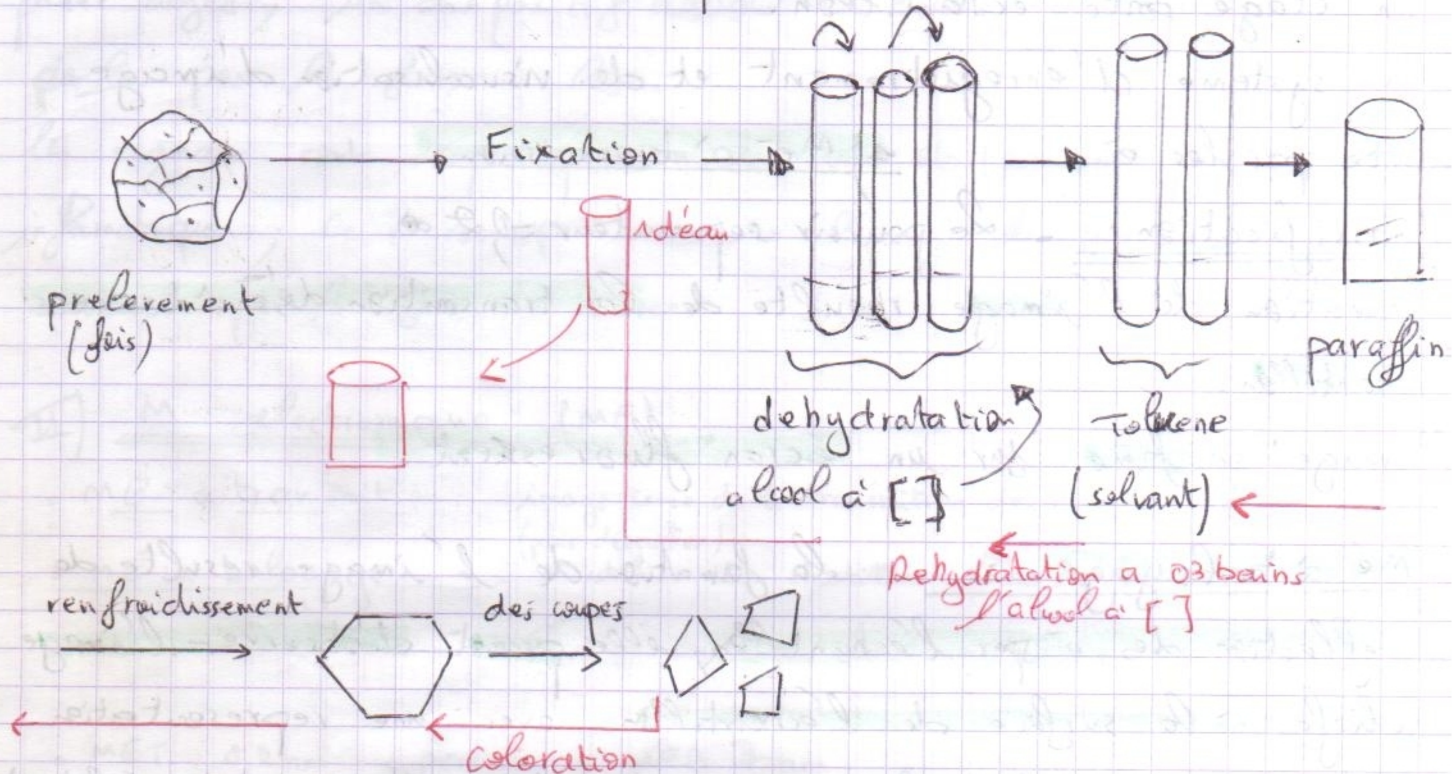
éviter la modefication ou la dinameration de la membrane (ou la cellule en generale).

2) Fixation : on vat fixé par des agent chimique comme l'acide. Sert à évitté l'attaque bactériel, et pour fixé l'echantillon et eviter l'autorisse
Et avant cette étape il faut on doit aprés

3) Inclusion : rendre l'echantillon
↳ Dehydratation + impregnation dans la paraffine + réalisation des coupes 05µm.
(Inclusion pour rendre l'echantillon solide) il faut passer par des étapes (alcol, toluene...)

4) Coloration : on fait un chemain inverse.

5) Observation : => M.O



II) Téchnique cytologique :

1) Prelevement (mêmes étapes)

2) Fixation (même role).
- On doit fixer les lipides (OsO4) et les proteines (par le glucoaldehyde).

3) Inclusion : - Dehydratation : on utilise de l'alcool (03 baines) en suit au lieu d'utiliser le "paraffite"

Inclusion
- déhydratation par l'alcool
- impregnation dans la résine.
- coupes ultrafines 0,1 μm.

4) Contraste aux métaux lourds : (pas de chemain inverse

5) Observation → MET

) Technique histolo d'étude de la ¢ :

I) Technique histologique :

1) Prelevement : consiste a recuperer l'echantillon → ponction
et piopsie

2) Fixation : distiné à immobilisé les structures cellulaire le plus proche possible de leur état naturel et de les concerver durablement.
bute : * Déplaté la distuction cellulaire par ~~pataliye~~ otolyse.
* Eviter une attaque bactériale.
* Permettre une coagulation des gôtes proteiques de la membrane plasmique (stabiliser la trâme proteique).
- Fixateur : - phesique comme chaleur, froid (congelation à l'azote liquide).
- Chimique : comme alcool, formol.
- Reincage : pour arrêter l'effets des fixateurs.
Inclusion pour rendre l'echantillon solide pour faciliter les coupes.

1) déhydratation : l'echantillon est déhydraté en passant par des concentration croissente en alcool (03 baines d'alcool, 30 minute chacun).
) Impregnation dans la paraffine : - Mieux periolable l'echantillon dans 02 baines de "Toluene" (solvant organique)
- Imprimer l'echantillon dans la paraffine liquide (T) 58° dans (une étuse)
Aprés reffroidissement on obtient un bloc solide, realisation des coupes fines à l'aide d'un microtome (~~scape~~ scalpel)
on realise les coupes à l'ordre de 05 µm.

Coloriation : Le bute : rendre plus évidant les constituants

- Déparaffinage : Chauffer les coupes fines puis les mettres dans 3 bains de toluène.

- Réhydratation : Mettre les coupes fines dans 3 bains d'alcool à concentration décroissante + un bain d'eau.

- Actions des colorants.

5) Montage sur lame de verre puis observation au MO puis interprétation de l'image.